

Fig. 2 Fluorescence autocorrelation curves for the water-soluble QDs with an emission peak at 610 nm and GFP in tetraborate buffer (pH = 9.2). The correlation curves are fitted by using one-component model (ref. 12c).

found to be 0.52, 0.53, 0.25, and 0.17 ms, respectively. By using the value of the diffusion time (0.74 ms) measured for 14 nm fluorescent latex beads (Molecular Probes, Inc. USA), the hydrodynamic sizes are calculated¹³ to be 9.8, 10, 4.7, and 3.2 nm in diameter for I-,¹⁴ MUA- and MPA-coated QDs, and GFP,¹⁵ respectively. The difference in the size of the MPA- and MUA-coated QDs suggests the ligand-exchange of TOPO molecules with the thiols. The size of I-coated water-soluble QDs is similar to that of MUA-coated QDs and is two-times larger than that of MPA-coated QDs, indicating that the calix[4]arene carboxylic acids form a bilayer structure with TOPO molecules that stabilize the surface of QDs. The high emission efficiency of I-coated QDs may result from the surrounding of the QD surface by the benzene units of the calixarene. The hydrophobic benzene layer would make a high shield towards the access of water molecules to the QD surface. As a result, surface quenching of excitons in the QD can be reduced.^{3d}

The colloidal stability of the I-coated QDs in tetraborate buffer is estimated by fluorescence intensity after surface coating as a function of time at 25 °C, as shown in Fig. 3. The fluorescence intensity of the I-coated QDs gradually increases and becomes constant after ca. 100 h. It should be noted that the spectral widths (the full width at half maximum) of the I-coated QDs are almost constant (29 nm) over time. This indicates that no surface deterioration and aggregation occurs in the I-coated QDs, and these QDs are stable in aqueous solution. For thiol-coated CdSe-ZnS QDs, poor stabilities resulting from the aggregation and

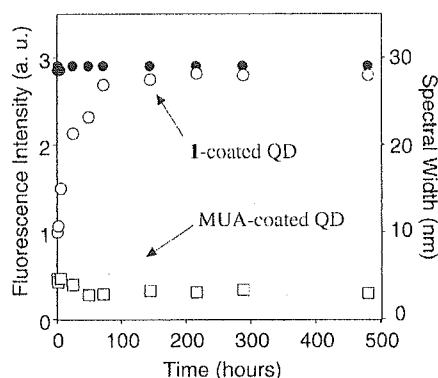


Fig. 3 Changes in fluorescence intensity (open circles and squares) of water-soluble CdSe-ZnS QDs (610 nm emission) after surface coating in tetraborate buffer (pH = 9.2). For I-coated QDs, changes in spectral widths are also shown (closed circles).

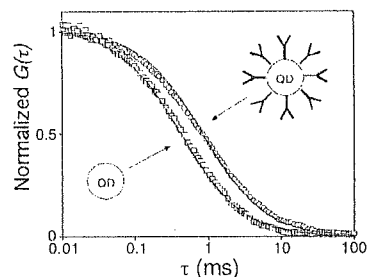


Fig. 4 Fluorescence autocorrelation curves for I-coated water-soluble CdSe-ZnS QDs with an emission peak at 610 nm before (open squares) and after (open circles) the addition of GFP antibody (PBS buffer, pH = 7.4) in the presence of EDC.

precipitation of the QDs have been reported in aqueous solution.^{3c,6} In fact, it was observed that fluorescence intensity of the MUA-coated QDs gradually decreases and loses 37% of its initial fluorescence intensity after 4 days (Fig. 3).

To test the utility of calixarene-coated QDs for biological application, the coupling of antibodies to the calixarene-coated QDs was performed using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC).¹⁶ Fig. 4 shows the fluorescence autocorrelation curves of I-coated QDs before and after the addition of GFP antibody (Mouse monoclonal IgG to GFP, Abcam Ltd, UK). Upon addition of the antibody, the autocorrelation curve of the I-coated QD immediately shifts to the right and the curve becomes stationary within 10 min. The diffusion time of the I-coated QDs changes from 0.52 ms to 1.0 ms. This change in the diffusion time indicates that the size of the antibody-labeled QD increases to be about twice that of the initial QD. From the value of the diffusion time, the size of the antibody-labeled QD can be estimated as ca. 20 nm in diameter, suggesting that the antibodies bind to the surface of the QD and form a single monolayer.

In conclusion, we have presented a simple and convenient method for the preparation of biocompatible CdSe-ZnS QDs using calix[4]arene carboxylic acids as surface coating agents. The calixarene-coated QDs have high emission efficiency and long-term stability in aqueous solution. In addition, the size of the calixarene-coated QDs is relatively small (<10 nm in diameter) in comparison with the water-soluble QDs earlier reported.^{5b} In the calixarene-coated QDs, calixarene molecules are bound to TOPO capped QDs by hydrophobic interaction. To avoid possible disintegration of the calixarene-coating in the case of interaction with the cell membrane (lipid bilayer), cross linking between the intramolecular carboxylic groups at the QD surface should be necessary. So far, many kinds of amphiphilic calixarene derivatives attaching sugars, peptides, chiral residues, and so on, have been designed.¹⁷ We believe that calixarenes will offer a variety of new functions for the surface architectures of colloidal semiconductor QDs.

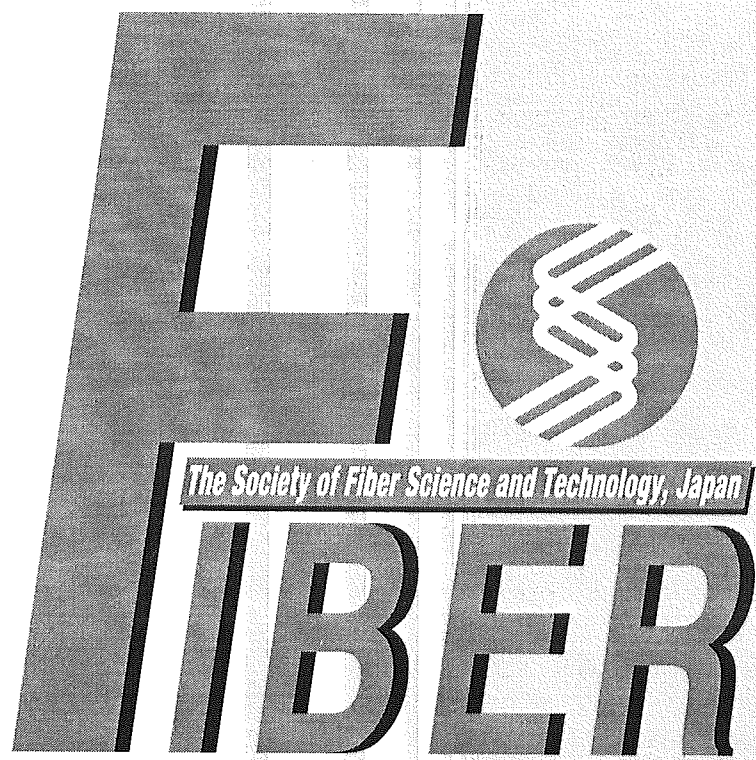
Takashi Jin,^{a,c} Fumihiko Fujii,^b Hiroshi Sakata,^b Mamoru Tamura^a and Masataka Kinjo^a

^aSection of Intelligent Materials and Devices, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Sapporo, 060-0812, Japan. E-mail: jin@iml.es.hokudai.ac.jp; Fax: +81-11-706-4964; Tel: +81-11-706-2886

^bInnovation Plaza Hokkaido, Japan Science and Technology Agency, Sapporo, 060-0819, Japan. Fax: +81-11-708-1614; Tel: +81-11-708-1614

Notes and references

- (a) M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos, *Science*, 1998, **281**, 2013; (b) W. C. W. Chan and S. Nie, *Science*, 1998, **281**, 2016; (c) M. E. Akerman, W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia and E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 12617.
- (a) C. B. Murray, D. J. Norris and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 8706; (b) M. A. Hines and P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 468; (c) B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen and M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem.*, 1997, **101**, 9463; (d) X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich and A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 7019; (e) M. Green and L. P. O'Brien, *Chem. Commun.*, 1999, 2235; (f) L. Qu and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 2049; (g) D. J. Crouch, P. O'Brien, M. A. Malik, P. J. Skabara and S. P. Wright, *Chem. Commun.*, 2003, 1454; (h) W. J. Jin, M. T. Fernández-Arquelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Chem. Commun.*, 2005, 883.
- (a) G. P. Mitchell, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 8122; (b) H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12142; (c) S. Pathak, S.-K. Choi, N. Arnheim and M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 4103; (d) D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss and A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 8861.
- (a) X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale and M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 41; (b) D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise and W. W. Webb, *Science*, 2003, **300**, 1434; (c) X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung and S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**, 969; (d) E.-C. Kang, A. Ogura, K. Kataoka and Y. Nagasaki, *Chem. Lett.*, 2004, **33**, 840.
- (a) B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou and A. Libchaber, *Science*, 2002, **298**, 1759; (b) T. Nann, *Chem. Commun.*, 2005, 1735.
- S. Kim and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 14652.
- The rate of FRET depends strongly on the donor-acceptor distance r , being inversely proportional to r^6 .
- The calix[4]arene carboxylic acid **1** was synthesized according to the literature methods: (a) A. Arduini, A. Pochini, S. Reverberi and R. Ungaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 981; (b) S.-K. Chang and I. Cho, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1986, 211.
- 1 mg of the TOPO capped CdSe-ZnS QDs was dispersed in 1 mL of tetrahydrofuran and 30 mg of calix[4]arene carboxylic acids **1** was added. After the mixed solution was sonicated for 30 s using a bath type sonicator, 3 mL of dimethylformamide was added. Then, 30 mg of potassium *tert*-butoxide was slowly added for the deprotonation of the carboxylic groups of the calix[4]arene. The resulting precipitate consisting of the QDs coated by **1** was separated using a centrifuge. The sedimented precipitate was then dispersed in 20 mL water. The aqueous QD dispersion was sonicated for 5 min and filtered using a 0.2 μm disposal filter.
- The quantum yield of the **1**-coated QDs with an emission peak at 535 nm is not estimated because the absorption of the QDs does not show a distinct peak.
- $G(\tau)$ is defined as $G(\tau) = \langle \delta I(\tau) \delta I(0) \rangle / \langle I(\tau) \rangle^2$, where $I(\tau)$ is the fluorescence intensity at the time τ , and $\delta I(\tau) = I(\tau) - \langle I(\tau) \rangle$. The brackets denote ensemble average.
- (a) S. Björling, M. Kinjo, Z. Földes-Papp, E. Hagman, P. Thyberg and R. Rigler, *Biochemistry*, 1998, **37**, 12971; (b) M. Kinjo, G. Nishimura, T. Koyama, Ü. Mets and R. Rigler, *Anal. Biochem.*, 1998, **260**, 166; (c) N. Yoshida, M. Kinjo and M. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **280**, 312; (d) T. Takagi, H. Kii and M. Kinjo, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2004, **5**, 199.
- Assuming a spherical body of fluorophores, the size of the fluorophores can be evaluated by the following relationship: $r_1/r_2 = \tau_1/\tau_2$, where r_i and τ_i are the radius and diffusion time of the fluorophore i .
- For the **1**-coated QDs with emission peaks at 535 nm and 575 nm, the hydrodynamic size was determined to be 6.2 nm and 7.9 nm in diameter, respectively.
- The GFP molecule forms a nearly perfect cylinder 4.2 nm long and 2.4 nm in diameter. See: M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington, *Science*, 1996, **273**, 1392.
- 10 μL of an aqueous dispersion of the QDs (ca. 1 μM) coated by **1** was diluted to 80 μL by addition of 70 μL PBS buffer (pH = 7.4) and 10 μL of EDC aqueous solution (5 mg mL^{-1}) was added. Then 10 μL of GFP antibody (5 μM) was added to the QDs aqueous solution and coupling reaction was allowed to proceed at room temperature. From the measurements of fluorescence autocorrelation curves of the QDs, it was found that the reaction was completed within 10 min. For the coupling reaction using EDC, see: G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York, 1996.
- Z. Aslari, V. Böhmer, J. Harrofield and J. Vicens, *Calixarene 2001*, Kluwer Academic Publishers, London, 2001.



The Society of Fiber Science and Technology, Japan

纖維学会誌

別刷

分子の探索からシステムの解明へ —アルツハイマー病研究に想う神経科学の今後への私感

From Molecules to Systems-A Private Opinion on Future Neuroscience¹⁾

星 美奈子

1. はじめに

30年前はまだ小学生でしかなかった自分が、「30年後の脳科学」を語るというのはどうにも荷が重く、正直なところ困り果てた。しかしながら、これはアルツハイマー病研究をとおして体感してきた神経科学の現状と今後を整理する良い契機かもしれないと思い、あくまで私感としてはあるがここに述べることにする。

神経科学最大の学会は、何といても秋に合衆国で開催される the Society for Neuroscience の年会である。年々参加者が増え、2004年については31000人を突破(研究者25000人、それ以外6000人)、6日間で16000を越える演題が、複数チャンネルで行われる15分刻みのスライドセッション、ないしは巨大会場で午前午後に分けて展示されるA-ZZまであるポスターセッションに分けて展開される。アルツハイマー病に関連する演題は軽く1000を越え、気力体力の限界を試される訳だが、学生・ポスドクに混じってポス達も興味あるポスターには自ら足を運び議論する学会であり、研究動向の目に見えない「雰囲気」をつかむには最適の場である。サブタイトルに挙げた Neurodegenerative Disorders, Neuroscience of Mental Illness & Stem Cell Research は2005年の焦点として President が掲げた分野である。これを見て感じることは、Kandel 博士がノーベル賞受賞決定直後の2002年の年会で断言したとおり、Life Science においてはもはや基礎も応用もない、ということである。そして、その結果、今まで以上に質の高い Concrete な成果が求められるようになってきている。合衆国においては、アルツハイマー病患者は500万人、年間10万人がこの病気で亡くなっており、2040年には患者数は1400万人に達するとされている。神経症(鬱病、統合失調症など)につい

ては、致死病でこそないが、疾病が社会の生産性に与えた損失が790億ドル、治療やケアに必要な費用が690億ドルと2003年に算定されている。また、確立された幹細胞を臨床応用に用いることに対しては、2005年のアンケートで58%が肯定するなど社会的理解もある。この状況に学会としても正面から向き合わざるを得ないことが良く伝わってきた。実は、数年前にふとしたことで類似の経験をしたことがあったからである。筆者は、「高次な生命現象を物質(タンパク質)の物理化学的な変化で説明する」という視点から研究に取り組み、この何年間かは、未だ謎が多いβアミロイドの神経細胞死機構の問題に取り組んでいる。そして、研究の過程で見出した新たな球状の構造体がとても強い神経毒性を持つことから「アミロスフェロイド」と名付け論文にまとめる機会を得た。その論文が契機となり、一般の方からの生の声は今もって定期的に届き、さらにアナリストの方々に自らの研究を語るという貴重な経験をする事となった。これによって社会的要請を文字通り肌身で感じただけでなく、現実には治療や予防ということを考えて時、基礎研究としては具体的にはどこまでを明らかにすれば「わかった」と言えるのか、そして自分の研究はどこに位置しているのか、ということをしつぱし思い巡らすようになった。その結果、応用に至ることが出来る基礎研究、「使える」研究というのは、likely や possible ではダメで、その段階で可能なことを全て終わらせ完結していないといけない、つまり、より高いハードルと責任があるということがわかった次第である。

2. 「物」「概念」「手法」

研究の novelty は、「物」「概念」「手法」のいずれかによることが多いが、脳・神経科学の場合、20世紀初頭までは組織の解剖学的・病理学的解析や動物の行動解析ないしは疾患の臨床解析から得られた「マクロな知見」のみであったものが、電気生理学と分子生物学の台頭によってミクロなレベルでの研究が可能になった。上記の3つに関しても、神経変性疾患については、関連分子が解明されつつあることで、それぞれの疾患において完全ではないながらも疾患モデル動物が作られてきたことが第一に挙げられ、具体的に治療戦略を考えるとところまで進行している。神経症については、発症機序についてはむしろ治療薬の作用機序を手掛かりに解明が進んでいることと、作用機序が

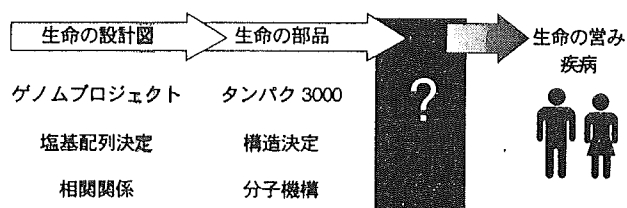
1) Neurodegenerative Disorders, Neuroscience of Mental Illness & Stem Cell Research



Minako M. Hoshi
三菱化学生命科学研究所・東京工業大学
大学院生命理工学研究科リーダー・連携
助教授 理学博士
〒194-8511 東京都町田市南大谷11号
E-mail: minhoshi@libra.ls.m-kagaku.co.jp
〈専門〉神経科学
〈趣味〉庭仕事

わからないためにモデル動物がなかった現状を、最近開発されつつある非侵襲的脳活動の可視化法が打破しつつあることがあげられる。そして幹細胞については、分化転換についての基礎的研究が進んだ結果、様々な know-how が蓄積したことが挙げられるであろう。このように新たな手法が新たな地平線を拓いてきたといっても過言ではない。アルツハイマー病を初めとする神経変性疾患の場合も、共通の病態として異常な蛋白質の蓄積が認められており、それが疾患の原因ともされている。しかしながら、本来、生化学・構造化学は均一でピュアな集団を扱うことに長けており、同じアミノ酸配列を持ちながら、様々な会合状態を取ったものの混合物で、しかも NMR で扱えるサイズを遙かに超えたものなど想定外であり、それぞれの疾患の原因蛋白質の会合過程を解析するために、多くの研究者が知恵を絞っては、ダイナミックな平衡状態にあるものを部分的に取り出しては観察していたのが現状であった。 β アミロイドの場合も全く同じ状況で、是非とも β アミロイドがアミロスフェロイドになる過程を解明したいと考えた筆者は、新たな解析手法を物理・化学・医学の分野横断研究で構築しようとしている。なぜなら、その後の研究から、アミロスフェロイドはヒト脳にも存在することが明らかになってきたため、アミロスフェロイド形成過程を解明することでアルツハイマー病発症の最初期を解明することが出来るからである。現在、手法の構築は順調に進んでいるが、その過程で見えたことは、手法というのは単独で成立するものではなく、何を知らたいか、何を見たいか、それがあって初めて成立するということであった。今年の学会、そして自らの些少な経験を踏まえて考えるに、今後はその研究の結果、何を見たいか、何を知らたいかということを含めて以上を意識した target-oriented な研究がますます増え、それに物理・化学・数学などの分野の研究者が参入し活躍するようになるのではないかと思う。分子を探索する 20 世紀は終わり、分子同士が構築するシステムを発見する時代、今まで→でつないでいた矢印の中味が問われる時代になったのである。

遺伝子と生命の営み（疾病）の間をつなぐ



3. 時間の流れ—老化とは

上記のような新たな流れを生み出した一つの要因はゲノ

ムプロジェクトによってヒトゲノムの全塩基配列が決定されたことである。これにより人類は 35 億年という進化の過程で培われてきた「生命の設計図」の解読に成功したこととなる。しかし、これで人体における生命の営み、その営みが異常になった疾患というものを全て説明出来るようになった訳ではない(図)。次の標的として、設計図に基づき作られ、生体内での機能を担うタンパク質の機能動態の解明が精力的に進められている。タンパク 3000 などの巨大プロジェクトによる構造ゲノム科学は、生命の営みを司る主なタンパク質の立体構造を全て明らかにすることでこれに迫らんとしており、それはいわば、設計図から部品を組み立てる段階に相当する。この流れを受け、遺伝性疾患の研究においても、原因遺伝子を明らかにする相関関係の解明から、遺伝子が作るタンパク質がどのように働き(あるいは働かないことで)疾患を起こすかを、具体的に明らかにする分子機構への発展が望まれている。これは、将来的に X 線結晶構造解析が新規タンパク質の特許要件になることにも明確に表れており、学術研究においても、企業研究としても、疾病研究は物質科学としての新たな局面を迎えたと言える。それでは、アルツハイマー病を初めとする、遺伝性が明らかではなく、頻度の高い神経変性疾患の発症機序はどのようにして解明されていくのであろうか？これに関しては、前述したとおり、この何年間かの医学研究、特に分子遺伝学・生化学・神経病理学のクロストークから、「異常構造タンパク質の凝集」が共通の病態であり、かつ病因であることが明らかになりつつある。しかしながら、それぞれの疾患において病因となるタンパク質が、なぜ生理的役割をはなれて病因となるのか、それはどのような構造変化を伴い、その結果神経の機能がなぜ阻害されるのかはまだ十分には理解出来ていないのが現状である。現時点で言えることは、いずれの場合もヒトが年を取ることと密接な関係にあるということである。従って、ヒトが老化する中で遺伝子(産物)がいかに変わるかが重要な課題となる。このように、生命の設計図、生命の部品と過去には想像もつかなかった勢いで解明されており、新たな局面が開けつつあるが、生命の営み全体を説明し、それが誤動作している疾患を克服するためには未だ大きな？が残されており、多くの研究者が独自の系と独自の観点からそれに挑戦している。筆者は蛋白質の機能は、実は life stage に応じて構造と共に変わりうるポテンシャルを持っているのではないかと夢想しており、この変遷に勝手に構造代謝と名付けている。我々の研究はまだ一步を踏み出したところだが、アミロスフェロイドを入りに、いずれは老化という現象を物理化学的に解明出来たら本望である。本執筆の機会を与えていただいた赤池先生に感謝いたします。